



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

Evaluation of the anti-inflammatory
effects of enrofloxacin
on lipopolysaccharide-induced
hyperactivated mouse spleen cells

濟州大學校 大學院

獸醫學科

高 亨 周

2019年 8月

Evaluation of the anti-inflammatory effects of enrofloxacin on lipopolysaccharide-induced hyperactivated mouse spleen cells

指導教授 朱 洪 球

高 亨 周

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함

2019年 6月

高亨周의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長_____ (印)

委 員_____ (印)

委 員_____ (印)

濟州大學校 大學院

2019年 6月

초록

Evaluation of the anti-inflammatory effects of enrofloxacin on lipopolysaccharide-induced hyperactivated mouse spleen cells

(지도교수: 주홍구)

고형주

제주대학교 수의학과 대학원

엔로플록사신은 수의학 분야에서 널리 사용되고 있는 광범위 항균제이다. 이것은 퀴놀론계 약물로서 균의 DNA복제시 DNA gyrase를 불활화시켜 항균작용을 나타낸다. 이번 연구의 목표는 이러한 항균작용 이외에 다른 작용 즉, 항염증작용의 가능성에 대해 평가하고자 함이다. 엔로플록사신의 항염증효과에 대한 연구가 이뤄진 것은 매우 소수에 불과하다. 이 연구에서는 대조군은 마우스의 비장세포에 엔로플록사신만을 적용하였고 비교군은 lipopolysaccharide (LPS)로 자극된 마우스의 비장세포에 엔로플록사신을 적용하였다. 결과적으로 엔로플록사신은 LPS로 자극된 마우스 비장세포의 대사활성도와 미토콘드리아막전위 수치를 감소시켰고 대표적인 염증성 물질인 TNF- α 의 수치도 감소시켰다. 염증반응이 없는 마우스 비장세포에서는 그 구성에 영향을 미치지 않았으며, Cell Death에도

영향을 주지 않았다. 이러한 결과로 볼 때 엔로플록사신은 LPS로 처리된 마우스 비장세포의 염증반응을 감소시키는데에 관여한다 할 수 있겠다. 이 결과는 엔로플록사신이 항균작용으로서의 역할과 함께 항염증작용까지 그 작용범위를 넓힐 수 있게 할 것이다.

Keywords: 엔로플록사신, 비장세포, 항염증활성, lipopolysaccharide,
미토콘드리아막전위

Abstract

Evaluation of the anti-inflammatory effects of enrofloxacin on lipopolysaccharide-induced hyperactivated mouse spleen cells

Supervised by professor Hong-Gu Joo

Hyeong-Ju Ko

College of Veterinary Medicine,
Graduate school,
Jeju National University

Enrofloxacin is a broad-spectrum antibiotic widely used in veterinary medicine. It is a fluoroquinolone and inhibits the action of bacterial DNA gyrase, resulting in anti-bacterial effects. The aim of this study is to determine whether enrofloxacin has modulatory and anti-inflammatory activity on immune cells. There are few studies on the anti-inflammatory effects of enrofloxacin. We used mouse spleen cells treated with lipopolysaccharide (LPS) and

investigated the effect of enrofloxacin. The several assays were measure in LPS-treated spleen cells after enrofloxacin treatment. Enrofloxacin significantly inhibited the metabolic activity and mitochondrial membrane potential of LPS-treated spleen cells. However, enrofloxacin did not alter the proportion of subsets in spleen cells, and also did not induce cell death. The production of tumor necrosis factor- α in LPS-treated spleen cells was inhibited by enrofloxacin. Taken together, enrofloxacin showed modulatory activity in the spleen cells treated with LPS. These data may broaden the use of enrofloxacin as an antibiotic with anti-inflammatory activity in veterinary clinics.

Keywords: enrofloxacin, spleen cells, anti-inflammatory activity, lipopolysaccharide, mitochondrial membrane potential

목 차

I. 서	론	-----	1
II. 재료	및 방법	-----	2
III. 결	과	-----	4
IV. 고	찰	-----	11
V. 참	고 문 헌	-----	13

I. 서론

Quinolone계 항생제는 광범위항생제이며, 초기에 nalidixic acid가 개발된 이래 최근에는 2세대 quinolone계 항생제인 fluoroquinolone이 다수 사용되고 있다[10]. Fluoroquinolone는 넓은 항균범위를 가지며 경구투여로도 높은 혈중농도를 얻을 수 있어 사람과 산업동물에서 비교적 안전하게 여러 감염증의 치료에 널리 사용되는 약물이다[3]. Quinolone계 항생제는 병원성 세균의 세포질 안으로 들어가 DNA 복제시 필요한 DNA gyrase를 불활화시켜 세포분열을 차단함으로써 살균효과를 나타낸다[10].

Fluoroquinolone계 약물은 항균작용뿐만 아니라 항염증작용을 하는 것으로 알려졌으며[2], ciprofloxacin, moxifloxacin은 lipopolysaccharide (LPS)로 자극된 사람의 monocyte에서 생성된 각종 염증매개물질들을 유의적으로 감소시키는 사실이 보고되었다[1,14,15]. 하지만 현재까지 자세한 항염증기전은 알려지지 않았다.

본 연구에서는 산업동물의 세균성 감염증에 널리 사용되고 있는 Enrofloxacin (EFX)이 항균작용 이외에 어떤 조절작용을 하는지 알아보고자, 주요 면역세포인 비장세포에 LPS를 이용하여 과활성화된 염증성 면역세포를 만든 후 EFX를 처리하여 그 효과를 확인하였다.

II. 재료 및 방법

실험동물과 시약

모든 실험에는 8-12주령 사이의 C57BL/6 마우스가 사용되었고, 동물실험은 제주대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 시행되었으며, 제주대학교 동물실험윤리지침을 준수하였다 (승인번호 2018-0011, 2019-0002). Enrofloxacin (EFX)은 바이트릴 25주 (Bayer, 25mg/ml)를 사용하였다.

비장세포의 분리와 물질처리

실험실에 확립된 방법을 통해 비장세포를 분리하였다[5]. 비장세포는 70 μ m cell strainer (BD Bioscience, USA)에 걸러 single cell 용액을 만든 후 계수하였고 96- 또는 6-well culture plates에 배양하였다. EFX와 LPS를 처리한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 조건에서 배양한 후 분석에 이용하였다.

비장세포의 대사활성 측정

비장세포를 2×10^6 cells/mL의 농도로 96-well culture plate에 넣은 후 EFX와 LPS를 처리하였다. 48시간 뒤 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) assay를 실시하였다[6]. 세포에 MTT용액을 0.5 mg/mL 농도로 4시간 동안 처리한 후 10% sodium dodecyl sulfate용액을 well당 100 μ L씩 넣어 2시간동안 반응시켰다. Microplate reader (Thermo Scientific사)를 이용해 흡광도 (570nm)를 측정하였다.

유세포분석

마우스 비장세포를 배양한 후 2×10^6 cells/mL의 농도로 6-well culture plate에 넣고 EFX와 LPS를 처리하였다. 48시간 배양한 후 mitochondrial membrane potential (MMP, 미토콘드리아 막전위)를 측정하기 위해 Rhodamine 123 용액으로 염색하였고, cell death (세포사) 측정을 위해 Annexin V-FITC와 propidium iodide 용액으로 염색하였다[9]. 또한 비장세포의 subset 변화를 분석하기 위해, T cell 과 B cell 특이적인 표면마커인 CD3 ϵ 와 CD19에 대한 특이항체를 사용하여 염색하였다[4]. 유세포분석은 CytoFLEX와 CytExpert software (Beckman Coulter, USA)를 이용해 분석하였다.

Tumor necrosis factor- α 정량

비장세포를 96-well culture plates에 넣은 후 LPS와 EFX를 처리하고 72시간 배양하였다. ELISA kit (Invitrogen사)를 이용해 배양된 세포의 상층액에 있는 tumor necrosis factor (TNF)- α 의 생산량을 측정하였다[7].

통계분석

Figure 1, 6은 평균 \pm 표준편차로 나타냈다. ANOVA 분석과 Turkey 검정으로 유의성을 확인하였으며, p value가 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 판단하였다.

III. 결과

비장세포의 대사활성도에 대한 Enrofloxacin (EFX) 의 효과

살아있는 마우스 비장세포의 대사활성도 (metabolic activity)를 측정하기 위해 MTT assay 를 이용하여 측정하였다. MTT assay 는 살아있는 세포에서 대사활성도를 측정하여 세포의 증식률, 생존율을 알아보는 분석법이다. EFX 는 단독으로 처리하였을 때 농도변화에 상관없이 세포의 대사활성도에 변화가 없었다. 반면 LPS 를 처리하였을 때는 EFX 에 의해 대사활성도가 감소되는 것을 확인하였다. 특히 EFX 의 농도가 25 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 대사활성도가 유의하게 감소하였다. (Fig. 1).

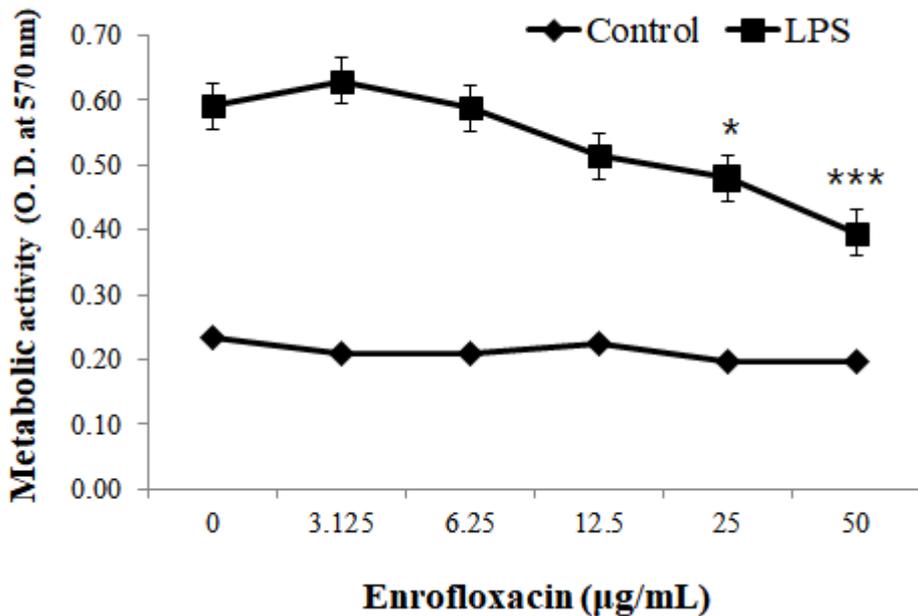


Fig. 1. EFX decreases the metabolic activity of LPS-treated spleen cells. Control, EFX were treated on spleen cells for 2 days. 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS was treated on other spleen cells with same concentration EFX. *, *** indicate $p < 0.05$, 0.001 respectively.

Enrofloxacin에 의한 비장세포의 미토콘드리아 막전위 변화

EFX 와 LPS 로 처리된 마우스 비장세포의 미토콘드리아막전위 (MMP) 변화를 분석하기 위해, 세포를 Rhodamine 123 용액으로 염색한 후 FACS 분석을 실시하였다. MMP 분석에서 EFX 만 처리한 세포에서는 유의한 변화가 없었지만, LPS 를 단독으로 처리한 세포에서는 MMP 수치가 높아졌고 이후 EFX 의 농도에 따라 농도의존적으로 MMP 수치가 낮아졌다. (Fig. 2).

또한 세포의 크기 (Forward scatter, FSC) 및 granularity (Side scatter, SSC)를 분석한 결과, LPS 가 처리되지 않은 세포에서 EFX 의 투여는 FSC/SSC 에 영향을 미치지 않았다. 반면, LPS 가 처리된 세포에서는 FSC/SSC 가 증가한 세포군이 관찰되었다. (P1 region). 또한 LPS + EFX 복합처리군에서는 EFX 의 농도에 비례하여 P1 region 의 세포수 (비율)가 18%에서 9%까지 감소하였다. (Fig. 3).

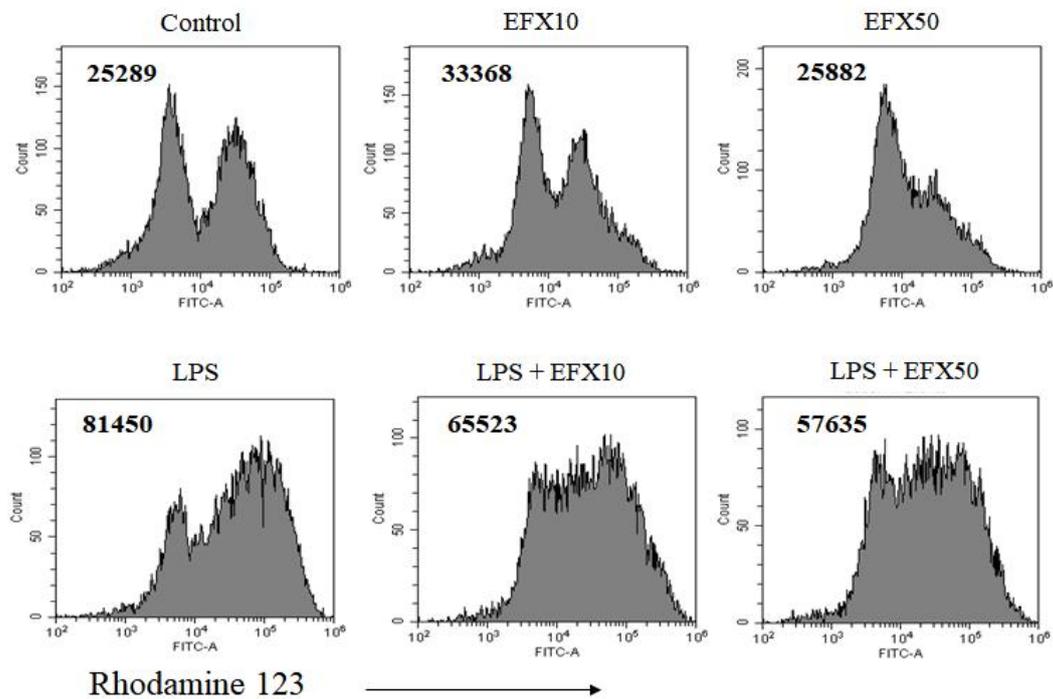


Fig. 2. EFX reduces the mitochondrial membrane potential (MMP) of spleen cells that were treated LPS. Three concentrations (0, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) EFX were treated on mouse spleen cells in 6-well culture plates with or without 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS for 2 days. The treated spleen cells were stained with Rhodamine 123 solution. The number of histograms indicates mean fluorescence intensities.

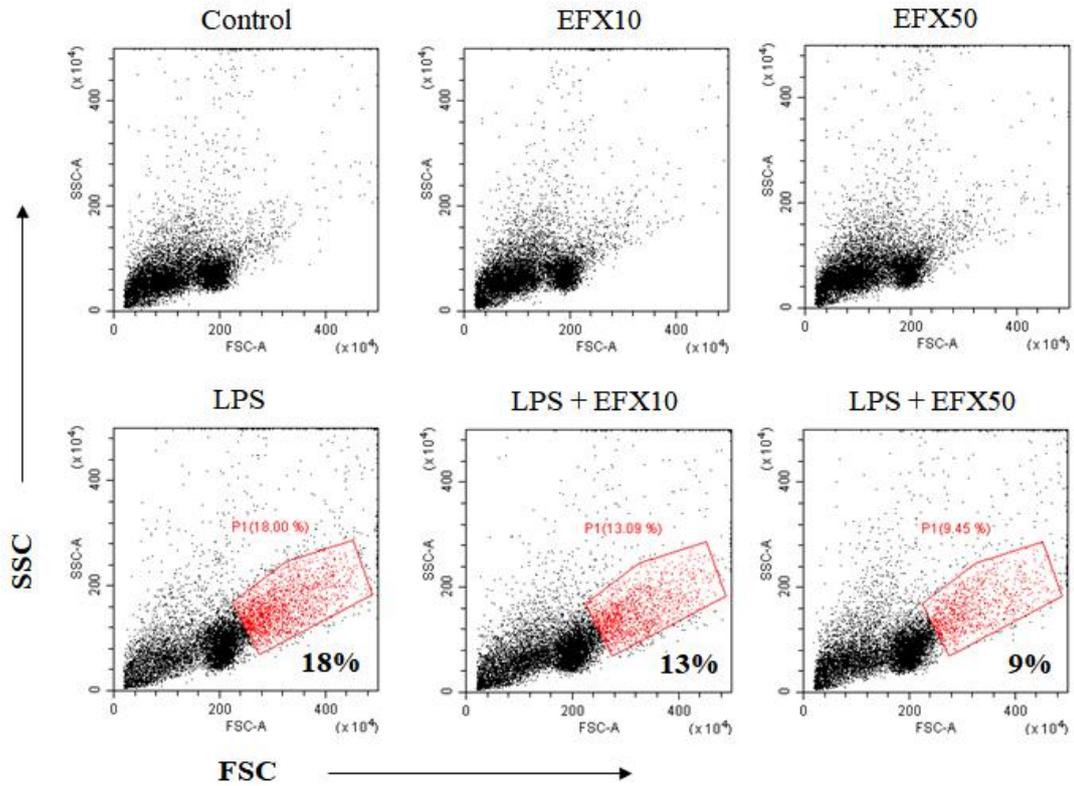


Fig. 3. EFX decreases the size of the splenocytes treated with LPS. The cells were treated with EFX (0, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The P1 region includes $\text{FSC}^{\text{high}}\text{SSC}^{\text{med}}$ cells by activated by LPS.

Enrofloxacin이 비장세포의 cell death에 미치는 영향

EFX와 LPS로 처리된 마우스 비장세포의 cell death를 확인하기 위해 Annexin V-FITC/propidium iodide로 염색한 후 유세포분석을 실시하였다. EFX는 LPS 유무에 관계없이 cell death의 변화가 없었다. (Fig. 4)

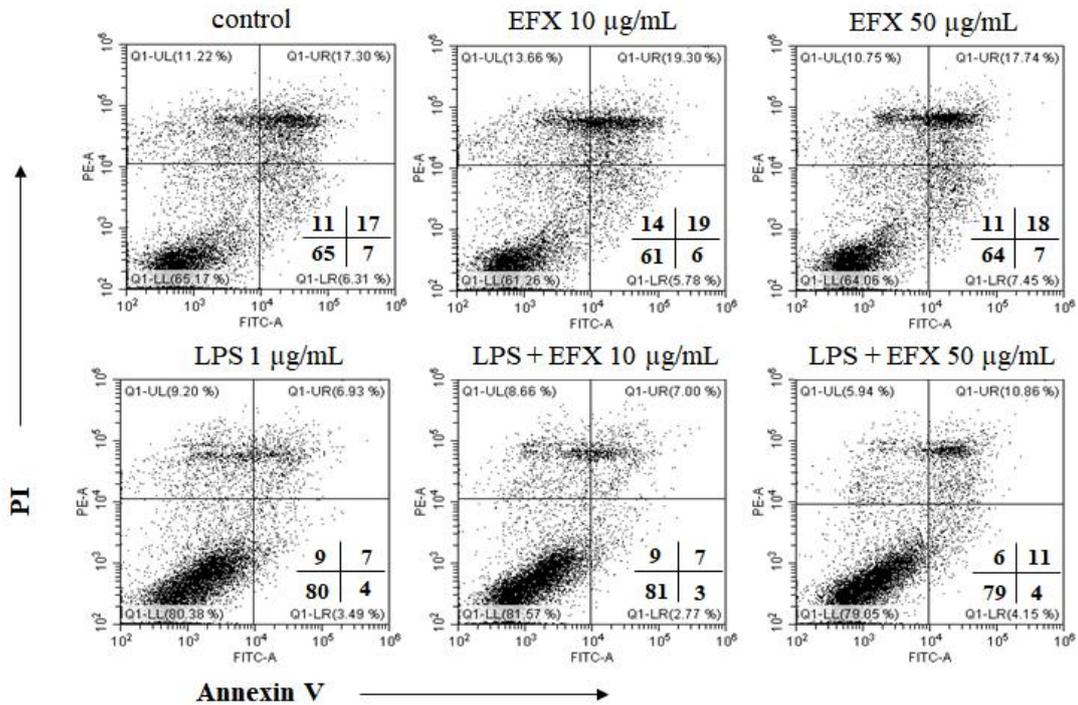


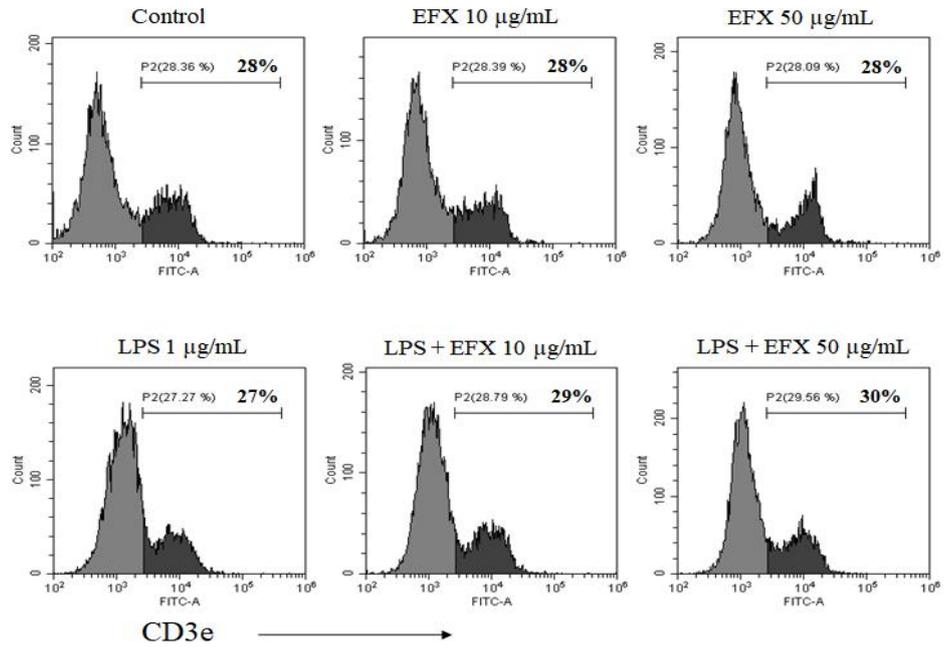
Figure 4. Enrofloxacin does not induce the cell death. The spleen cells were treated with EFX (0, 10, 50 µg/mL) and LPS (1 µg/mL) for 2 days. The treated cells were stained with annexin V-FITC/PI for cell death analysis. The numbers in quadrants indicates the percentage of cells in viable (lower left), early apoptosis (lower right), late apoptosis (upper right), necrosis (upper left).

비장세포의 T림프구와 B림프구의 구성에 enrofloxacin이 미치는 영향

마우스 비장세포는 T림프구와 B림프구로 구성되었다. EFX이 그 구성에 어떤 영향을 미치는 지 알아보기 위해, EFX와 LPS를 비장세포에 처리한 후 CD3ε와 CD19 특이적인 항체를 이용해 염색했다.

유세포분석을 실시한 결과, LPS 유무에 관계없이 enrofloxacin 처리에 의해 T림프구와 (Fig. 5A) B림프구의 (Fig. 5B) 구성에서 유의한 변화가 관찰되지는 않았다.

A



B

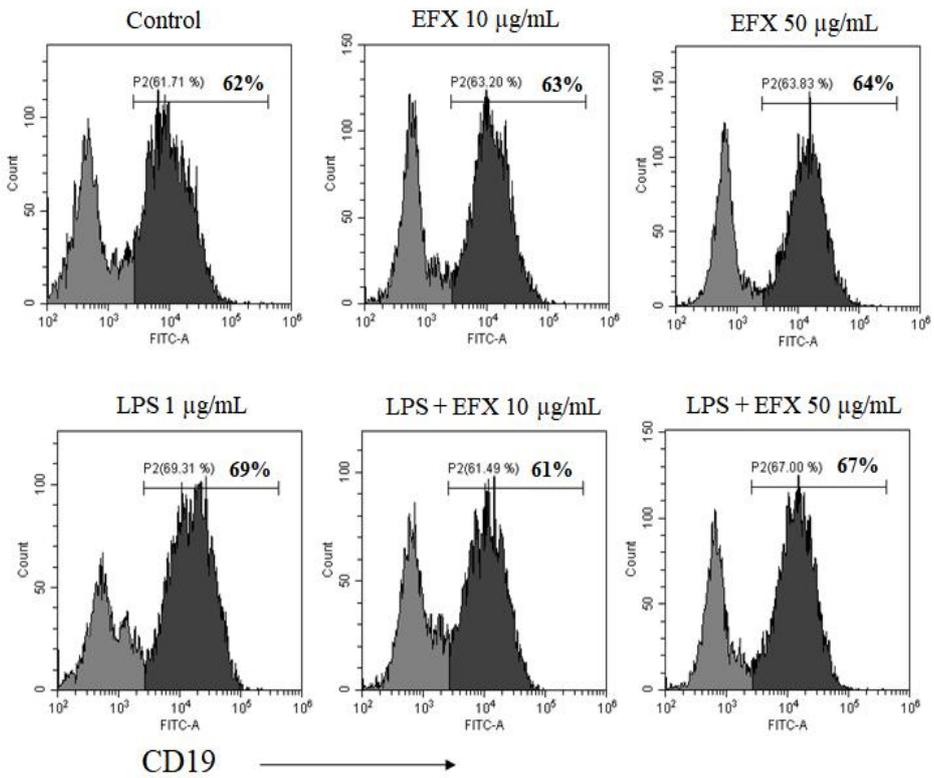


Figure 5. Enrofloxacin does not alter the proportion of lymphocytes. The spleen cells were treated with EFX (0, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 2 days. The treated cells were stained with biotin-labeled CD3 ϵ (A), CD19 (B) specific antibody and streptavidin-FITC sequentially. The stained cells were analyzed by FACS. The lymphocyte region (P1) and the positive region of each marker (P2) were gated sequentially. The number in histograms indicates the value of P2 subtracted with that of isotype control (4.59%).

Enrofloxacin에 의한 비장세포의 TNF- α 생산 감소

마우스 비장세포를 EFX와 LPS로 처리하여 3일간 배양한 후 대표적인 염증성 물질 중 하나인 TNF- α 생산량을 측정하였다. LPS를 처리한 세포에서는 TNF- α 의 수치가 높았고, 여기에 더해 EFX를 6.25 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 세포에서는 감소하였지만 통계적으로 유의하지는 않았다. (Fig. 6).

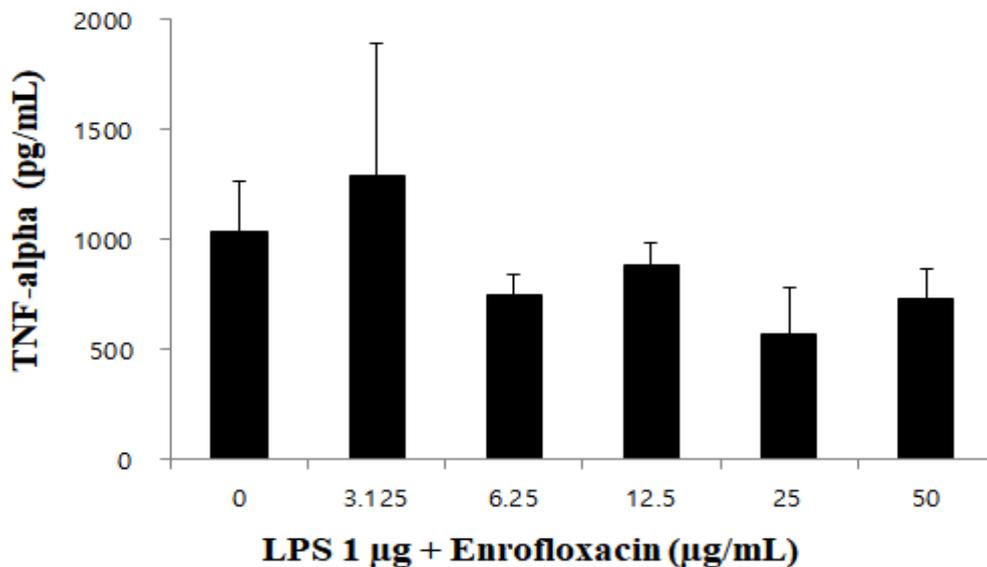


Figure 6. Enrofloxacin decreases the production of TNF- α in LPS-treated spleen cells. The cells were cultured and treated LPS and EFX in 96-well culture plates as in Fig. 1. The amount of TNF- α in the supernatants was measured using ELISA. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) from four individual wells.

IV. 고찰

Quinolone계 항생제의 항염증효과에 대한 연구는 제한적으로 보고된 바 있다. 사람의 단핵구를 LPS로 자극한 후에 ciprofloxacin을 처리하였더니 IL-1 β , IL-6 그리고 TNF- α 의 생산이 억제되었으며[14], moxifloxacin을 적용하여 IL-1 α 와 TNF- α 의 분비가 유의하게 감소되는 사실을 확인하였다 [1,15]. 수의임상에서 많이 사용되는 enrofloxacin 또한 싸이토카인의 생산 조절이 보고되었다[11]. 하지만 염증성 싸이토카인의 생산 저하 이외에 quinolone계 항생제의 면역세포에서 조절작용에 대한 연구는 매우 부족한 실정이다. 본 연구에서는 산업동물에서 대표적인 항생제로 사용되고 있는 enrofloxacin의 조절작용을 알아보기 위해, 마우스의 비장세포에 LPS를 처리한 후 분석하였다.

LPS로 처리된 비장세포의 경우 enrofloxacin 25 ~ 50 μ g/mL의 농도 범위에서 대사활성도와 MMP 모두 감소하였다. 또한 LPS에 의해 FSC/SSC가 증가한 구역 (P1 region)의 세포 수도 enrofloxacin에 의해 감소되었다. 하지만 LPS를 처리하지 않은 비장세포의 경우 enrofloxacin에 의한 변화는 관찰되지 않았다. 또한 enrofloxacin에 의해 감소된 대사활성도가 세포가 죽으면서 활성도가 떨어진 것인지를 확인하기 위해 Annexin V-FITC/PI 분석을 실시하였는데 cell death의 변화는 관찰되지 않았다. 특히 PI는 세포핵을 염색하여 cell death의 변화를 민감하게 보여줄 수 있지만[13], late apoptosis와 necrosis 모두에서 뚜렷한 변화가 없었다. 따라서 대사활성도의 감소가 세포사에 의한 것이 아니라 세포대사의 저하에 의한 것으로 추정된다. Enrofloxacin은 T림프구와 B림프구의 비율에도 영향을 주지 않았다.

TNF- α 는 대표적인 염증성 싸이토카인으로 다양한 종류의 세포에서 LPS에 의해 증가한다[8,12]. TNF- α 의 생산량을 확인한 결과,

Enrofloxacin은 6.25 ~ 50 µg/mL 범위에서 감소시켰지만 통계적으로 유의하지는 않았다.

LPS가 염증성 자극인자로서 비장세포를 과활성화시키고 염증유사반응을 유도하는 사실을 감안하면, 본 연구의 결과들은 enrofloxacin이 염증시 면역세포에 작용하여 항염증효과를 나타낼 수 있는 가능성을 보여준다. 산업동물에서 염증발생시 처방약물로서 항생제와 소염제가 많이 사용되며, 소염제 중 특히 스테로이드는 많은 부작용을 동반한다.

Enrofloxacin이 항생효과 이외에도 항염증효과가 있다는 사실은 소염제의 사용을 줄일 수 있는 근거가 될 수 있어, 산업동물 임상에 유용한 정보가 될 수 있을 것으로 기대된다.

V. 참고문헌

1. **Araujo FG, Slifer TL, Remington JS.** Effect of moxifloxacin on secretion of cytokines by human monocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Clin Microbiol Infect* 2002, **8**, 26-30.
2. **Dalhoff A.** Immunomodulatory activities of fluoroquinolones. *Infection* 2005, **Suppl2**, 55-70.
3. **Heeb S, Fletcher MP, Chhabra SR, Diggle SP, Williams P, Cámara M.** Quinolones: from antibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiol Rev* 2011, **35**, 247-274.
4. **Jang JY, Moon SY, Joo HG.** Differential effects of fucoidans with low and high molecular weight on the viability and function of spleen cells. *Food Chem Toxicol* 2014, **68**, 234-238.
5. **Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ.** Expression and function of galectin-3, a β -galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2001, **69**, 555-564.
6. **Kim MH, Byon YY, Ko EJ, Song JY, Yun YS, Shin T, Joo HG.** Immunomodulatory activity of ginsan, a polysaccharide of *Panax ginseng*, on dendritic cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 2009, **13**, 169-173.
7. **Kim SY, Joo HG.** Evaluation of adjuvant effects of fucoidan for improving vaccine efficacy. *J Vet Sci* 2015, **16**, 145-150.
8. **Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ.** The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001, **104**, 487-501.
9. **Moon SY, Joo HG.** Anti-inflammatory effects of 4,4'-diaminodiphenyl sulfone (dapson) in lipopolysaccharide-treated spleen cells: selective

- inhibition of inflammation-related cytokines. *Korean J Vet Res* 2015, **55**, 199-204.
10. **Paton JH, Reeves DS.** Fluoroquinolone antibiotics. *Microbiology, pharmacokinetics and clinical use. Drugs* 1988, **36**, 193-228.
 11. **Pomorska-Mól M, Czyżewska-Dors E, Kwit K, Pejsak Z.** Enrofloxacin in therapeutic doses alters cytokine production by porcine PBMCs induced by lipopolysaccharide. *Drug Chem Toxicol* 2017, **40**, 295-299.
 12. **Raabe T, Bukrinsky M, Currie RA.** Relative contribution of transcription and translation to the induction of tumor necrosis factor-alpha by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1998, **273**, 974-980.
 13. **Ross DD, Joneckis CC, Ordóñez JV, Sisk AM, Wu RK, Hamburger AW, Nora RE.** Estimation of cell survival by flow cytometric quantification of fluorescein diacetate/propidium iodide viable cell number. *Cancer Res* 1989, **49**, 3776-3782.
 14. **Sachse F, von Eiff C, Becker K, Rudack C.** Anti-inflammatory effects of ciprofloxacin in *S. aureus Newman* induced nasal inflammation *in vitro*. *J Inflamm* 2008, **5**, 11.
 15. **Shalit I, Halperin D, Haite D, Levitov A, Romano J, Osherov N, Fabian I.** Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on IL-8, IL-1beta and TNF-alpha secretion and NFκB and MAP-kinase activation in human monocytes stimulated with *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 2006, **57**, 230-235.